

X染色体不活性化における機能的RNAとde novoメチル化酵素の相互作用

●佐渡 敬

国立遺伝学研究所総合遺伝研究系

〈研究の目的と進め方〉

X染色体不活性化に必須な機能性RNA分子であるXistが、X染色体全域に結合した後、どのようにして不活性化が達成されるのかはまったく分かっていない。しかし、我々はその過程にde novoメチル化酵素Dnmt3a, Dnmt3bが関わっている可能性を見出した。本研究では、Xist RNAとこれらde novoメチル化酵素の相互作用が染色体レベルの大規模な遺伝子発現制御に関わっている可能性をES細胞の系で検討するとともに、これまでの結果がマウス胚における実際のX染色体不活性化過程を反映したものをDnmt3a, Dnmt3b二重欠損マウスを用いて調べることが目的とした。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1) de novoメチル化酵素欠損ES細胞にテトラサイクリンによるDnmt3a, Dnmt3bの発現誘導系を導入し、機能的de novoメチル化酵素を細胞の分化誘導過程の様々な時期に補うことで、Xistの発現やX染色体の活性にどのような影響を及ぼすか調べる。
- 2) de novoメチル化酵素欠損マウス胚におけるX染色体不活性化を調べる。

〈研究期間の成果〉

- 1) テトラサイクリンによるDnmt3a, Dnmt3bの発現誘導系をde novoメチル化酵素欠損ES細胞へ導入することはできた。しかし、これらの酵素の発現を誘導しても、Xistプロモーターにおけるメチル化の回復は認められなかった。また、分化誘導後Xistを異所的に発現している状況でDnmt3a, Dnmt3bを誘導しても、X染色体不活性化よると思われる細胞死は引き起こされなかった。X染色体不活性化が細胞分化と密接に関わっていることを考えると、de novoメチル化酵素欠損ES細胞では、異所的なXistの発現が不活性化を誘導するのに重要な分化段階経過後に起こるため、染色体の不活性化には至らないのではないかと考えられる。後述のDnmt3a/Dnmt3b二重欠損マウス胚の結果もこれを支持する。
- 2) Xistの発現はそのアンチセンス遺伝子Tsixによって負に制御されることが知られる。しかし、Tsixの機能を壊したオスES細胞は、正常に増殖することからTsixの機能破壊が直ちにXistの発現を招きその唯一のX染色体の不活性化を引き起こしてはいないと思われた。そこで、Tsix欠損オスES細胞におけるXistの発現について詳細な解析を行った結果、ES細胞が由来するエピブラストの細胞系譜ではTsixに依存しないXistの制御機構も備わっていることが示唆された(1)。
- 3) 細胞分化にともなうXist遺伝子の二者択一的な発現亢進がX染色体の不活性化の鍵を握っている。XistのプロモーターのCpG配列は、その発現が認められる不活性X染色体上では非メチル化状態であるのに対し、発現が抑えられている活性X染色体上では高度にメチル化されている。このことから、Xistの二者択一的な発現亢進はこのメチル化の差によって制御されている可能性が指摘さ

れていた。これまで、維持型DNAメチル化酵素(Dnmt1)欠損マウスの解析から、DNAメチル化パターンの維持はX染色体不活性化に必須ではないが、Xistの安定な発現抑制には重要であることが示されていた。しかし、Xistプロモーターの二者択一的なメチル化が単アレル性のXistの発現の原因なのか結果なのかは不明であった。我々は、Xistの発現制御と不活性状態の確立におけるDNAメチル化の意義を検討するため、de novo DNAメチル化酵素欠損マウス胚の解析を行った。その結果、細胞分化にともなうXistの二者択一的な発現機構にde novo DNAメチル化は必須ではないことが明らかとなった。また、X染色体不活性化自体も正常に進行することが示された。これらは、X染色体不活性の開始は、DNAメチル以外のエピジェネティックな修飾によって制御されていることを示唆している(2)。

〈国内外での成果の位置づけ〉

X染色体不活性化におけるDNAメチル化の重要な役割として、Xist遺伝子の発現調節が考えられてきた。しかし、本研究から、Xistの二者択一的なメチル化は不活性化の開始に必ずしも必須ではないことが初めて示された。また、染色体ワイドの不活性化過程、あるいは不活性状態の伝播にもDNAメチルが必須ではないことも明らかとなった。こうした解析は、約30年にわたって議論されてきたX染色体不活性化過程におけるDNAメチル化の意義について一応の決着をつけたという点で国内外で一定の評価を得ている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

de novoメチル化酵素欠損ES細胞に導入したテトラサイクリンによるDnmt3a, Dnmt3bの発現誘導系自体は、おおむね良好に機能したが、得られた結果は予想とは異なるものであった。したがって、必ずしも当初計画した方向へは展開しなかったが、X染色体不活性化におけるde novoメチル化の意義については興味深い結果が得られたと思う。

〈今後の課題〉

これまで、DNAメチル化やヒストンの修飾、クロマチン構造の変化はそれぞれ遺伝子発現をエピジェネティックに調節する機構として注目されてきた。しかし、近年、遺伝子発現制御におけるnon-coding RNAやヒストンメチル化の役割がクローズアップされ、DNAメチル化とともにこれらの相互作用を総合的に検討することがエピジェネティクスを研究する上で不可欠となってきている。今後、Dnmt3a/Dnmt3b二重欠損がXist遺伝子領域における他のエピジェネティックな修飾の構築にどのような影響をおよぼしているか、あるいは逆に他のエピジェネティックな修飾を欠損した場合にDNAメチル化にどのような影響が現れるか検討する必要がある。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 0309101151

Sado, T., Li, E., and Sasaki, H. Effect of Tsix disruption on Xist expression in male ES cells. *Cytogenet. Genome Res.*, 99, 115-118 (2002).

2. 0602091706

Sado, T., Okano, M., Li, E., and Sasaki, H. De novo DNAmethylation is dispensable for the initiation and propagation of X chromosome inactivation. *Development* 131, 975-982 (2004).